

Aus dem Institut für Pharmazie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. P. Nickel

METABOLISIERUNG VON PROGESTERON IN
LEBER, OVAR, MAMMA UND DMBA-TUMOR
DER WEIBLICHEN RATTE
WASSERSTOFFÜBERTRAGUNG VON
ÖSTRADIOL AUF PROGESTERON

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael Langold

aus Karlsruhe

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pharmazie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. P. Nickel

METABOLISIERUNG VON PROGESTERON IN
LEBER, OVAR, MAMMA UND DMBA-TUMOR
DER WEIBLICHEN RATTE
WASSERSTOFFÜBERTRAGUNG VON
ÖSTRADIOL AUF PROGESTERON



INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Langold
aus Karlsruhe

Referent: Prof. Dr. M. Wenzel

Korreferent: Prof. Dr. F. Neumann



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 1. 11. 1978

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung und Fragestellung	1
Material und Methoden	4
Ergebnisse:	
Östradiol-Oxydation und Progesteron-Stoffwechsel in Leber	11
Östradiol-Oxydation und Progesteron-Stoffwechsel im Ovar	30
Stoffwechsel von Östradiol, Progesteron und Androstendion in normalem Mammagewebe und in DMBA-induzierten Mammacarcinomen der Ratte	34
Diskussion	45
Zusammenfassung	55
Literatur	57

Einleitung und Fragestellung

Die Metabolisierung von Progesteron in verschiedenen Gewebearten der weiblichen Ratte wurde von zahlreichen Autoren (1-14) in vivo und in vitro untersucht. Als Hauptabbauweg in der Leber wurde die Reduktion des Ring A nachgewiesen (1). Die Reduktion der Ketogruppe am C₂₀ der Seitenkette konnte ebenfalls, jedoch in nur geringem Ausmaß nachgewiesen werden (2,8). Außerdem wurde eine strenge Stereo-Spezifität der Reduktasen festgestellt, da sowohl in der Leber (6) als auch bei Versuchen mit eviscerierten Ratten in vivo nur die 3 α -5 α -Reduktionsprodukte gefunden wurden (3-5).

Dieselbe strenge, geschlechtsgebundene Stereo-Spezifität der Δ_4 -Reduktasen haben Wenzel und Mitarbeiter (17-19) auch für die Reduktion von Androstendion in Leberschnitten weiblicher und männlicher Ratten nachgewiesen, wobei in weiblicher Rattenleber nur die 3 α -5 α -reduzierten Metaboliten auftraten.

Im Gegensatz dazu wird Progesteron in Rattenovarien fast ausschließlich am C₂₀ der Seitenkette reduziert. Dabei entsteht Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol (3-5). Bei Inkubation der Mikrosomenfraktion von Ovarien trächtiger Ratten mit Progesteron und NADH haben Zmigrod (10) und Mason (13) allerdings auch die am Ring A reduzierten Progesteronmetaboliten identifizieren können.

Bei Inkubation von Androstendion mit Rattenovarien fanden Wenzel und Pollow (17) den an C₁₇ reduzierten Metaboliten Testosteron.

Die nur an C₂₀ reduzierten Progesteronmetaboliten, die in vivo offenbar im Ovar und in der Nebennierenrinde gebildet werden, können auch im menschlichen Organismus nachgewiesen werden (15). Nach Träger (16) findet man in menschlichen Ovarien mehr Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol als Progesteron selbst. Dieser Metabolit hat im Gegensatz zu den am Ring A reduzierten Progesteronmetaboliten noch eine biologische Wirksamkeit. Zudem besteht noch die Möglichkeit, daß Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol wieder zu Progesteron oxydiert wird, wie dies im menschlichen Endometrium nachgewiesen wurde (16).

Wenzel und Mitarbeiter haben in Inkubationsversuchen mit stoffwechsellabil markierten Substanzen eine gegenüber anderen NAD-reduzierenden Substraten bevorzugte Wasserstoffübertragung von einem Steroid auf ein anderes in verschiedenen Organen der Ratte (17-21) und in der Mikrosomenfraktion von Rattenleberzellen (22-26) nachgewiesen. Ausgehend von diesen Arbeiten sollten folgende Fragen geprüft werden:

1. Findet eine Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron statt?
2. Wird der Metabolisierungsweg des Progesteron durch die Anwesenheit von Östradiol verändert?

Dazu wurden Inkubationsversuche mit weiblicher Rattenleber, mit Ovarien und mit Mammagewebe durchgeführt. Ein weiterer Teil der Arbeit befaßt sich mit dem Stoffwechsel von Progesteron und Androstendion in Mammatumoren von weiblichen Ratten, die durch Gabe von 7,12-Dimethyl-benzanthrazen (28) induziert worden waren.

Diese Tumoren sind von mehreren Autoren (28-36) eingehend hinsichtlich ihrer Hormonabhängigkeit und ihrer Fähigkeit, Steroidhormone aufzunehmen untersucht worden. Ebenso vielfältig und zum Teil auch erfolgreich sind die Versuche derselben Autoren, das Wachstum dieser Tumoren durch Gabe von Steroiden oder durch Entzug von Steroidhormonen durch Kastration, durch Hypophysektomie und andere Maßnahmen zu hemmen. Östrogenrezeptoren wurden nachgewiesen und deren Hemmung durch andere Steroide an der geringeren Östrogenaufnahme in den Tumor oder an der Regression des Tumors gemessen.

Es gibt jedoch nur wenige Arbeiten, in denen die Metabolisierung von Steroidhormonen in diesen Tumoren untersucht wird. Breuer (37), der den Stoffwechsel von Östradiol in Inkubationsversuchen mit DMBA-Tumoren geprüft hat, fand Östron und Östriol als Metaboliten.

Es sollte deshalb in dieser Arbeit geprüft werden, ob Progesteron in DMBA-Tumoren metabolisiert wird, und welche Unterschiede sich hierbei im Vergleich mit normalem Mammagewebe ergeben.

Sofern die Größe des einzelnen Tumors es zuließ, wurde außerdem noch die Metabolisierung von Androstendion untersucht.

Material und Methoden

Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche Ratten eines Wistar-Stammes eingesetzt. Zur Induktion von Mammatumoren wurden weibliche Tiere eines Sprague-Dawley-Stammes als Versuchstiere herangezogen. Alle Tiere erhielten eine Standardkost und Trinkwasser ad libitum.

Induktion von Mammatumoren

80 weibliche Tiere eines Sprague-Dawley-Stammes erhielten im Alter von 50 ± 3 Tagen mit der Magen-sonde eine einmalige Dosis von 20 mg 7,12-Dimethylbenzanthrazen in Öl gelöst verabreicht. Die Tiere wurden wöchentlich nach Tumoren untersucht. Die Hormonabhängigkeit der Tumoren wurde nicht geprüft.

Radioaktive Steroide

Östradiol- 17α -T (98,2 Ci/Mol) wurde von der Schering AG, Berlin zur Verfügung gestellt. Progesteron-4- ^{14}C (21,7 Ci/Mol), Androstendion-4- ^{14}C (56,7 Ci/Mol) und Östradiol-4- ^{14}C (54,4 Ci/Mol) wurden vom Radiochemical Centre Amersham bezogen.

Molekulargewichte:

Östradiol- 17α -T	272
Progesteron-4- ^{14}C	315
Androstendion-4- ^{14}C	286
Östradiol-4- ^{14}C	272

Gewinnung der Gewebeschnitte

Die Versuchstiere wurden mit Chloroform narkotisiert. Die erforderlichen Organe wurden entnommen und in eiskalte Ringerlösung ($\text{pH}=7,4$) gebracht. Die Zeit zwischen Entnahme der Organe und Inkubationsbeginn betrug nicht mehr als 15 Minuten.

Leber wurde auf Eis mit der Rasierklinge in möglichst dünne Scheiben (ca. 0,5mm) geschnitten. Für jeden Versuchsansatz wurden 100 ± 10 mg dieser Schnitte eingesetzt.

Normales Mammagewebe wurde mit der Schere zerkleinert und 200 ± 20 mg der Gewebeschnitte pro Versuchsansatz eingesetzt.

Mammatumoren wurden wie Leber in möglichst dünne Scheiben geschnitten und 200 ± 20 mg der Gewebeschnitte eingesetzt. Der Rest des Tumors wurde zur nachträglichen histologischen Untersuchung in 4%iger Formalinlösung fixiert.

Ovarien wurden völlig von dem umgebenden Fettgewebe freipräpariert, mit der Schere zerkleinert und jeweils ein Ovar mit ca. 50 ± 10 mg pro Versuchsansatz eingesetzt.

Inkubation

Die Gewebeschnitte wurden bei 37°C in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer ($\text{pH}=7,4$) aerob in einem Schüttelthermostaten inkubiert.

Die dem Inkubationsgemisch zugesetzten Steroide wurden in 0,2 ml Äthanol gelöst. Das Gesamtvolumen des einzelnen Inkubationsansatzes betrug 4,2 ml. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 60 Minuten. Eine Ausnahme davon machen die Versuche, in denen eine Zeitabhängigkeit der Stoffwechselvorgänge untersucht werden sollte. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Inkubationsgefäße in eiskaltes Wasser gestellt, und die Ansätze sofort weiterverarbeitet.

Aufarbeitung der Inkubationsansätze

Zur Wiedergewinnung der eingesetzten Steroide und deren Metaboliten wurde der Gesamtansatz einmal mit 5 ml Chloroform, die Gewebeschnitte danach dreimal mit 5 ml Äthanol extrahiert. Die gesammelten organischen Extrakte wurden unter einem Preßluftstrom in einem Wasserbad von 50°C zur Trockne eingedampft. Der trockene Rückstand wurde in 3mal 0,2 ml Äthanol aufgenommen und als eine 2,5 cm lange und maximal 0,5 cm breite Bande auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und chromatographiert.

Zur HTO-Bestimmung wurden 0,5 ml des wässrigen Überstandes nach der Chloroformextraktion in der Kälte destilliert und ein Aliquot im Scintillationszähler "Beckman LS 150" gemessen.

Chromatographie

Die Chromatographie wurde aufsteigend auf Kieselgel-HF₂₅₄-Dünnschichtplatten (DC-Fertigplatten der Firma Merck, Darmstadt) durchgeführt.

Zur Trennung der Progesteronmetaboliten untereinander und von Östradiol war das Laufmittelsystem

Chloroform-Aceton (9:1)

besonders geeignet.

Zusätzlich erforderliche Trennungen erfolgten im Laufmittelsystem

Äther-Dimethylformamid (99:1).

R_F -Werte in Chloroform-Aceton (9:1):

Östradiol	0,31
Progesteron	0,74
Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol	0,41
5 α -Pregnan-3,20-dion	0,70
5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on	0,42
5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol	0,29
Androstendion	0,50
Testosteron	0,26
5 α -Androstan-3 α ,17 α -diol	0,16
5 α -Androstan-3 α -ol-17-on	0,34
5 α -Androstan-3,17-dion	0,59

R_F -Werte in Ätner-Dimethylformamid (99:1):

Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol	0,29
Δ_4 -Pregnen-3-on-20 β -ol	0,34

Nach der Chromatographie wurden die Metaboliten durch UV-Licht oder durch Färbung mit Antimontrichlorid-Eisessig sichtbar gemacht und mit gleichzeitig chromatographierten, authentischen Referenzsubstanzen verglichen.

Messung der Radioaktivität

Die Messung der radioaktiven Chromatogramme erfolgte mit dem Dünnschicht-Scanner II kombiniert mit dem Autochron-Recorder (Laboratorium Prof.Dr. Berthold, 7547 Wildbad).

Für größte Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen ist die Verwendung der oben genannten Dünnschichtplatten mit exakt der gleichen Schichtdicke notwendig. Die Zählausbeute betrug hier für ^{14}C etwa 30%, für ^3H etwa 1%.

Anfange wurde, wie von Wenzel (27) beschrieben, die Aktivität doppelt markierter Substanzen mit dem Dünnschicht-Scanner direkt auf dem Chromatogramm gemessen. Dabei wird das Chromatogramm einmal ohne und einmal mit einer Blende, die die β -Strahlung des Tritium völlig absorbiert, gemessen.

Genauere Messungen auch kleinster doppelt markierter Substanzmengen wurden durch Abschaben der radioaktiven Maxima von der DC-Platte und Eluieren der radioaktiven Substanzen im Flüssigkeits-Scintillationszähler "LS 150" der Firma Beckman in getrennten ^{14}C - und ^3H -Kanälen durchgeführt.

Die Zählausbeute betrug hier für ^{14}C etwa 61%, für ^3H etwa 36%. Die Zählausbeute wurde bei jeder Meßserie mit Hilfe einer Standardprobe neu bestimmt.

Zur Bestimmung der HTO-Ausbeute wurden die Proben in der Kälte destilliert und ein Aliquot des Destillats ebenfalls im Flüssigkeits-Scintillationszähler gemessen.

Identifizierung der Metaboliten

Die Lagebestimmung der Metaboliten auf der Dünnschichtplatte erfolgte durch direkte Aktivitätsmessung mit dem Dünnschicht-Scanner II. Eine zunächst orientierende Kontrolle wurde erreicht durch gleichzeitig aufgetragene authentische, inaktive Referenzsubstanzen, die nach der Chromatographie entweder durch UV-Licht oder durch Färbung mit Antimontrichlorid-Eisessig sichtbar gemacht wurden.

Da die radioaktiven Maxima durch geringe Überlappung mit benachbarten radioaktiven Substanzen meist noch Gemische darstellten, wurde die zu identifizierende radioaktive Zone sorgfältig von der Dünnschichtplatte abgeschabt, dreimal mit je 5 ml Aceton eluiert, und

dieses Substanzgemisch im Laufmittelsystem Äther-Dimethylformamid (99:1) rechromatographiert. Danach erlaubten direkte Aktivitätsmessung und Vergleich mit gleichzeitig chromatographierten Referenzsubstanzen in allen Fällen eine Reindarstellung der zu identifizierenden Substanz.

Zur endgültigen Identifizierung wurden folgende Methoden herangezogen:

Oxydation

Zur Oxydation der Hydroxylgruppen zu Ketogruppen wurde eine Lösung aus 26,7 g CrO_3 und 23 ml H_2SO_4 konz., die mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt worden war, verwendet. Diese Lösung wurde dem bei $0-5^\circ\text{C}$ in Aceton gelösten Steroid zugetropft, bis eine deutliche Gelbfärbung bestehen blieb. Nach 10 Minuten wurde Eiswasser zugegeben, und das Oxydationsprodukt mit Hexan extrahiert.

Reduktion

Zur Reduktion der Ketogruppen zu Hydroxylgruppen wurde das Steroid bei 0°C in Methanol gelöst und 1 mg Natriumborhydrid zugegeben. Nach 2 Stunden wurde das Reduktionsprodukt mit Hexan extrahiert.

Acetylierung

Zur Acetylierung wurden zu der trockenen Probe 0,2 ml Pyridin und 0,2 ml Essigsäureanhydrid gegeben und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurde die Probe zur Trockne eingedampft, und das acetylierte Steroid in Aceton aufgenommen.

Umkristallisation

Die Konstanz der spezifischen Aktivität (ipm/mg) der radioaktiven Metaboliten wurde nach Zugabe von 0,5 g der authentischen Referenzsubstanz durch mehrmaliges Umkristallisieren aus verschiedenen organischen Lösungsmitteln geprüft.

Operative Kastration der weiblichen Ratten

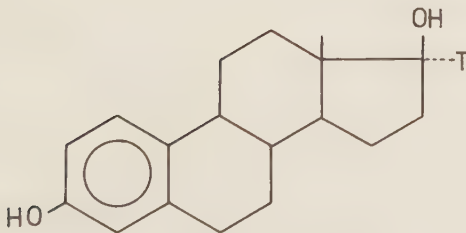
Zur operativen Kastration wurden die Versuchstiere in Äthernarkose auf dem Operationstisch fixiert. Nach Eröffnen der Bauchhöhle durch einen Unterbauchmittelschnitt wurden beide Ovarien dargestellt. Gefäße und Bänder wurden mit Catgut ligiert, und beide Ovarien exstirpiert. Verschluss der Bauchhöhle mit Catgutnähten. Nach 2-4 Wochen wurden die Tiere zu den Versuchen herangezogen.

Für die histologischen Diagnosen der DMBA-Tumoren danke ich Herrn Dr.med. Seelig, Path. Inst. der Freien Universität Berlin, Krankenhaus Westend, 1000 Berlin 19, (Direktor: Prof.Dr.med. V. Becker).

Ergebnisse

Östradiol-Oxydation und Progesteronstoffwechsel in Leber

Bei Inkubation mit Leberschnitten weiblicher Ratten wird Östradiol-17 α -T oxydiert. Das in 17 α -Stellung stoffwechsellabil eingebaute Tritium (siehe untenstehende Formel) wird dabei von der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase auf NAD übertragen. Im weiteren Verlauf der Atmungskette entsteht so tritiiertes Wasser (HTO). Leberschnitte erwachsener und trächtiger Rattenweibchen oxydieren unter gleichen Bedingungen zwei- bis viermal mehr Östradiol-17 α -T unter Bildung von HTO als Leberschnitte infantiler und kastrierter Weibchen (Tab.1).



Östradiol-17 α -T

Tabelle 1

Bildung von HTO durch Oxydation von Östradiol-17 α -T in Leberschnitten weiblicher Ratten

Mittelwerte aus Doppel- und Dreifachbestimmungen.

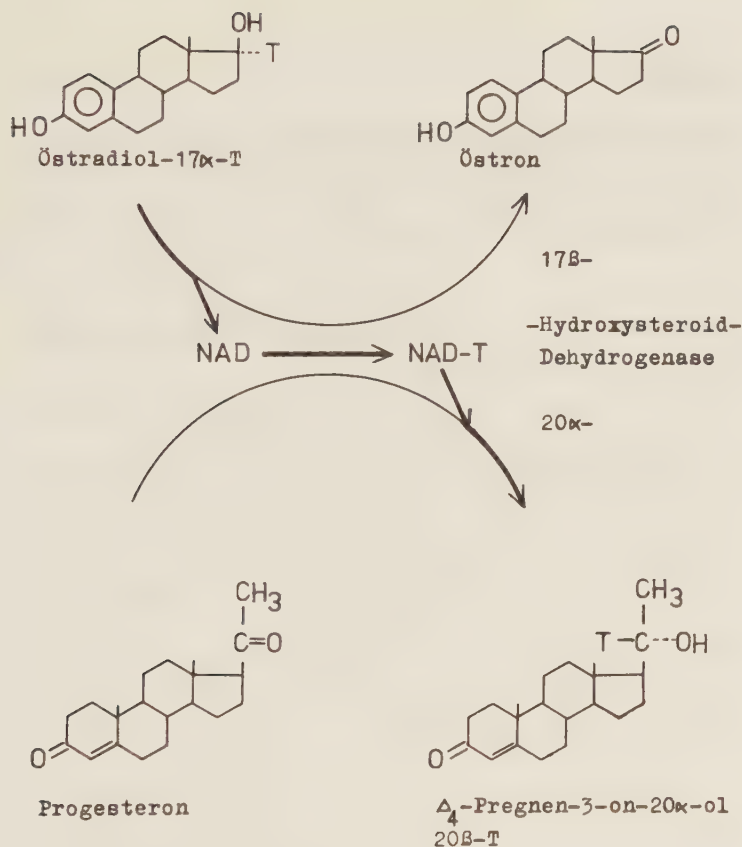
Inkubationsbedingungen: 100 $\pm$ 10 mg Leberschnitte in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob, 60 min.

Eingesetztes Steroid:

7,84 μ Ci Östradiol-17 α -T (19 μ Mol/l) in 0,2 ml Äthanol gelöst.

Versuchstier	HTO aus Östradiol-17 α -T	
	in % der eingesetzten Aktivität	in μ Mol pro mg Gewebe pro Minute
geschlechtsreif	16,9 ($\pm$ 2,7)	$2,24 \times 10^{-6}$
trächtig	17,5 ($\pm$ 3,5)	$2,32 \times 10^{-6}$
infantil	8,1 ($\pm$ 1,2)	$1,07 \times 10^{-6}$
kastriert	3,9 ($\pm$ 0,8)	$0,51 \times 10^{-6}$

Das intermediär auf NAD übertragene Tritium wird jedoch nicht nur zur Bildung von HTO verwendet. In Inkubationsversuchen mit Östradiol-17 α -T und inaktivem Progesteron konnte in Rattenleber eine Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron nachgewiesen werden, wie sie in dem folgenden Formelschema für die Tritiumübertragung vom C₁₇ des Östradiol auf das C₂₀ des Progesteron dargestellt ist.



Bei der Aufarbeitung dieser Inkubationsansätze fanden sich zwei radiochromatographisch nachweisbare, tritiierte Progesteronmetaboliten (Abb.1). Diese konnten als 5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on (Tab.2) und als Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol (Tab.3) identifiziert werden. In den Kontrollversuchen ohne Progesteron wurde radiochromatographisch nur das noch nicht metabolisierte Östradiol-17 α -T nachgewiesen (Abb.1).

Tabelle 2

Identifizierung von 5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on

a = Chloroform-Aceton (9:1)

b = Äther-Dimethylformamid (99:1)

DC = Dünnschichtchromatographie

- | | |
|----------------------|--|
| 1. DC in a | $R_F=0,42$ identisch mit dem von authentischem 5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on. |
| DC in b | $R_F= 0,72$ identisch mit dem von 5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on. |
| 2. Nach Acetylierung | $R_F=0,58$ identisch mit dem der gleichzeitig acetylierten Referenzsubstanz. |
| DC in a | |
| DC in b | $R_F=0,97$ identisch mit dem der gleichzeitig acetylierten Referenzsubstanz. |
| 3. Nach Oxydation | $R_F=0,70$ identisch mit dem von 5 α -Pregnan-3,20-dion. |
| DC in a | |
| DC in b | $R_F=0,84$ identisch mit dem von 5 α -Pregnan-3,20-dion. |
| 4. Nach Reduktion | $R_F=0,29$ identisch mit dem der reduzierten Referenzsubstanz. |
| DC in a | |
| DC in b | $R_F=0,64$ identisch mit dem der reduzierten Referenzsubstanz. |

Ergebnis: 5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on.

Tabelle 3

Identifizierung von Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol
³H- und ¹⁴C-markiert.

a = Chloroform-Aceton (9:1)

b = Äther-Dimethylformamid (99:1)

DC = Dünnschichtchromatographie

- | | |
|--|--|
| 1. DC in a | R _F =0,41 identisch mit dem von Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol. |
| DC in b | R _F =0,29 identisch mit dem der Referenzsubstanz. |
| 2. Nach Acetylierung | R _F =0,68 identisch mit dem der acetylierten Referenzsubstanz. |
| DC in a | |
| DC in b | R _F =0,72 identisch mit dem der acetylierten Referenzsubstanz. |
| 3. Nach Reduktion | R _F =0,33 identisch mit dem der reduzierten Referenzsubstanz. |
| DC in a | |
| 4. Nach Oxydation | 96% der Tritiumaktivität wurden |
| der ³ H- und ¹⁴ C- | in der wässrigen Phase der |
| markierten Sub- | Oxydationslösung wiedergefunden. |
| stanz. | |
| Nach Eindampfen | |
| der organischen | |
| Phase der | |
| Oxydationslösung | |
| (¹⁴ C-markierte | |
| Substanz enthaltend) | |
| DC in a | R _F =0,74 identisch mit dem von Progesteron. |

Ergebnis: Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol (-4-¹⁴C-20B-³H).

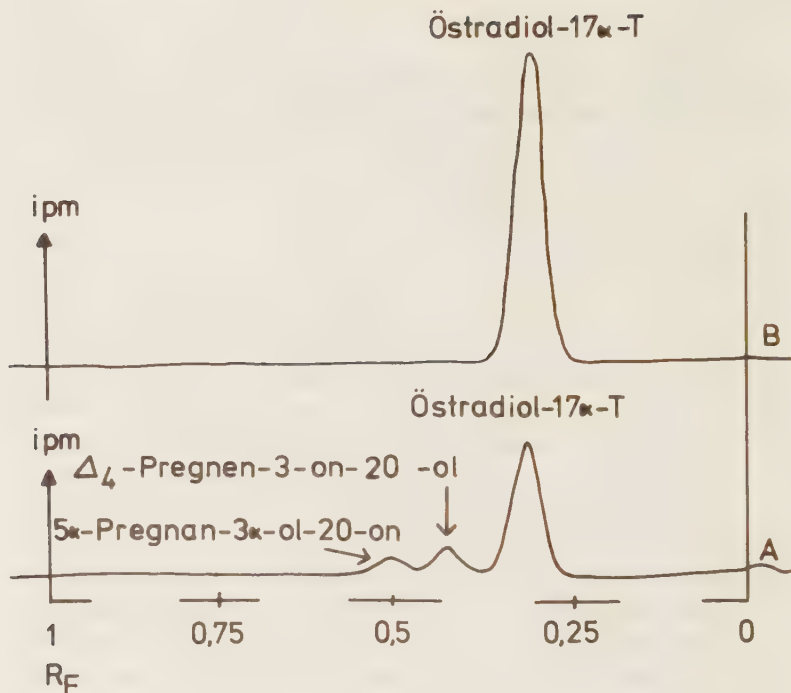


Abb. 1 Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron in Leberschnitten weiblicher Ratten.
Radiodünnschichtchromatogramm im Laufmittelsystem Chloroform-Aceton (9:1).

Inkubationsbedingungen: 100 $\pm$ 10 mg Leberschnitte in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob, 60 min.

Eingesetzte Steroide: (in 0,2 ml Äthanol gelöst)

A 7,84 μ Ci Östradiol-17 α -T (19,0 μ Mol/l)

100 γ Progesteron (75,7 μ Mol/l)

B 7,84 μ Ci Östradiol-17 α -T (19,0 μ Mol/l)

Da bisher in weiblicher Rattenleber die Reduktion des Ring A als Hauptabbauweg des Progesteron galt (1,2), erschien die Menge des nur am C₂₀ reduzierten Progesteronmetaboliten Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol mit 7,9% der eingesetzten Aktivität ($0,73 \times 10^{-6}$ μ Mol/mg Gewebe/min.) ungewöhnlich hoch (Tab.4).

Tabelle 4

Reduktion von Progesteron durch Östradiol-17 α -T in Leberschnitten weiblicher Ratten.

Mittelwerte aus Doppel- und Dreifachbestimmungen.
Inkubationsbedingungen: 100 $\pm$ 10 mg Leberschnitte in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob, 60 min.

Eingesetzte Steroide (in 0,2 ml Äthanol gelöst):
5,45 μ Ci Östradiol-17 α -T (13,2 μ Mol/l)
100 γ Progesteron (75,7 μ Mol/l)

Wiedergefundene Radioaktivität in	in % der eingesetzten Aktivität	in μ Mol/mg Gewebe/min.
Östradiol-17 α -T	48,5 ($\pm$ 6,5)	$4,48 \times 10^{-6}$
HTO	16,9 ($\pm$ 2,7)	$1,56 \times 10^{-6}$
Δ_4 -Pregnen 3-on-20 α -ol	7,9 ($\pm$ 2,1)	$0,73 \times 10^{-6}$
5 α -Pregnan- 3 α -ol-20-on	6,4 ($\pm$ 1,9)	$0,59 \times 10^{-6}$

Die Gesamtwiederfindung betrug durchschnittlich 79,7% der eingesetzten Aktivität.

Um den Einfluß von Östradiol auf die Metabolisierung von Progesteron zu klären, wurden in weiteren Versuchen Leberschnitte weiblicher Ratten mit Progesteron-4-¹⁴C allein und in Anwesenheit von Östradiol als Wasserstoffdonator inkubiert. Abbildung 2 zeigt die radiochromatographisch dargestellten Progesteronmetaboliten. Schon in der Abbildung wird aus der Größe der radioaktiven Maxima deutlich erkennbar, daß erheblich mehr Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol aus Progesteron entsteht, wenn dem Inkubationsgemisch Östradiol zugegeben wurde.

Die quantitativen Ergebnisse der Inkubationsversuche mit Leberschnitten erwachsener, trächtiger, infantiler und kastrierter weiblicher Ratten sind in den Tabellen 5-8 zusammengestellt.

Bei alleiniger Inkubation von Progesteron-4-¹⁴C mit Leberschnitten konnten im Wesentlichen die Befunde von Taylor (1) und Shirley (2) bestätigt werden. Sowohl bei erwachsenen (Tab.5) und trächtigen (Tab.6) als auch bei infantilen (Tab.7) und kastrierten (Tab.8) Rattenweibchen fanden sich überwiegend die am Ring A reduzierten Metaboliten.

Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol und 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol konnten nur in geringer Menge nachgewiesen werden.

Bei Anwesenheit von inaktivem Östradiol im Inkubationsgemisch ergab sich jedoch eine erhebliche Verschiebung zugunsten der an der Seitenkette reduzierten Metaboliten. Diese Verschiebung trifft für erwachsene, trächtige, infantile und kastrierte Weibchen in gleicher Weise zu. Bei dieser Versuchsanordnung konnte die bis zu 180-fache Menge der an der Seitenkette reduzierten Metaboliten nachgewiesen werden.

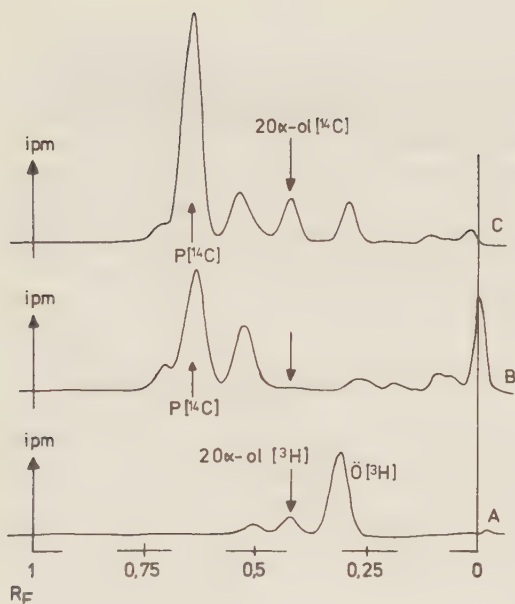


Abb.2 Reduktion der 20-Ketogruppe des Progesteron durch Östradiol in Leberschnitten weiblicher Ratten.

Radiodünnschichtchromatogramm im Laufmittelsystem Chloroform-Aceton (9:1).

Inkubationsbedingungen: 100±10 mg Leberschnitte in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob, 60 min.

Eingesetzte Steroide: (in 0,2 ml Äthanol gelöst)

Unten (A) 5,45 µCi Östradiol-17α-T (13,2 µMol/l)

100% Progesteron (75,7 µMol/l)

Mitte (B) 0,58 µCi Progesteron-4-¹⁴C (6,35 µMol/l)

Oben (C) 0,58 µCi Progesteron-4-¹⁴C (6,35 µMol/l)

100% Östradiol (87,5 µMol/l)

Abkürzungen:

P(¹⁴C) = Progesteron-4-¹⁴C

20α-ol(¹⁴C) = Δ₄-Pregnen-3-on-20α-ol(-4-¹⁴C)

20α-ol(³H) = Δ₄-Pregnen-3-on-20α-ol(-20B-³H)

Ö(³H) = Östradiol-17α-T

Tabelle 5

Einfluß von Östradiol auf die Metabolisierung von Progesteron in Leberschnitten adulter weiblicher Ratten.

Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Inkubationsbedingungen: 100±10 mg Leberschnitte in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob, 60 min.

Eingesetzte Steroide (in 0,2 ml Äthanol gelöst):

0,1 µCi Progesteron-4-¹⁴C (1,1 µMol/l)

100 γ Östradiol (87,5 µMol/l)

Wiedergefundene ¹⁴ C-Aktivität als	in µMol/mg Gewebe/min. (x10 ⁻⁸).		
	(A) ohne Östradiol	(B) mit Östradiol	$\frac{B}{A}$
5α-Pregnan-3,20-dion	7,08±0,5	2,07±0,2	73,5 19,3
5α-Pregnan-3α-ol-20-on	13,01±0,6	9,24±1,9	
5α-Pregnan-3α,20α-diol	0,07±0,01	5,15±1,7	
Δ ₄ -Pregnen-3-on-20α-ol	0,31±0,05	6,00±2,9	
Progesteron	43,35±0,9	46,97±9,9	
Übrige, nicht identi- fizierte Steroide	5,24±1,0	1,38±0,1	

Die Gesamtwiederfindung der ¹⁴C-Aktivität betrug durchschnittlich 90,8%.

Tabelle 6

Einfluß von Östradiol auf die Metabolisierung von Progesteron in Leberschnitten trächtiger Ratten.

Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Inkubationsbedingungen wie Tab.5.

Wiedergefundene ¹⁴ C-Aktivität als	in $\mu\text{Mol/mg Gewebe/min. (}\times 10^{-8}\text{)}$		
	(A) ohne Östradiol	(B) mit Östradiol	$\frac{B}{A}$
5 α -Pregnan-3,20-dion	5,92 $\pm$ 0,2	3,62 $\pm$ 0,5	
5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on	19,25 $\pm$ 3,0	11,16 $\pm$ 1,1	
5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol	0,07 $\pm$ 0,01	5,85 $\pm$ 0,2	83,5
Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol	0,38 $\pm$ 0,07	7,31 $\pm$ 0,9	19,5
Progesteron	28,18 $\pm$ 0,4	38,19 $\pm$ 0,3	
Übrige, nicht identi- fizierte Steroide	13,62 $\pm$ 2,0	2,23 $\pm$ 0,7	

Tabelle 7

Einfluß von Östradiol auf die Metabolisierung von Progesteron in Leberschnitten infantiler weiblicher Ratten.

Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Inkubationsbedingungen wie Tab.5.

Wiedergefundene ¹⁴ C-Aktivität als	in $\mu\text{Mol/mg Gewebe/min. (}\times 10^{-8}\text{)}$		
	(A) ohne Östradiol	(B) mit Östradiol	$\frac{B}{A}$
5 α -Pregnan-3,20-dion	2,88 $\pm$ 0,3	2,00 $\pm$ 0,4	
5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on	7,78 $\pm$ 0,4	12,73 $\pm$ 1,7	
5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol	0,08 $\pm$ 0,01	11,71 $\pm$ 1,9	146,3
Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol	0,08 $\pm$ 0,01	14,51 $\pm$ 2,3	181,3
Progesteron	33,47 $\pm$ 1,5	15,18 $\pm$ 1,3	
Übrige, nicht identi- fizierte Steroide	20,58 $\pm$ 3,5	6,13 $\pm$ 0,9	

Tabelle 8

Einfluß von Östradiol auf die Metabolisierung von Progesteron in Leberschnitten kastrierter weiblicher Ratten.

Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Inkubationsbedingungen wie Tab.5.

Wiedergefundene ^{14}C -Aktivität als	in $\mu\text{Mol/mg}$ Gewebe/min. ($\times 10^{-8}$)		
	(A) ohne Östradiol	(B) mit Östradiol	$\frac{B}{A}$
5 α -Pregnan-3,20-dion	5,00 $\pm$ 0,9	2,33 $\pm$ 0,6	5,7 138,0
5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on	16,55 $\pm$ 0,8	13,49 $\pm$ 1,3	
5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol	1,72 $\pm$ 0,4	9,81 $\pm$ 1,7	
Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol	0,08 $\pm$ 0,01	11,04 $\pm$ 2,6	
Progesteron	26,65 $\pm$ 1,3	21,76 $\pm$ 4,8	
Übrige, nicht identi- fizierte Steroide	11,16 $\pm$ 2,5	6,36 $\pm$ 2,8	

Bei Inkubation von Leberschnitten weiblicher Ratten dient Östradiol also nicht nur als Wasserstoffdonator für die Reduktion des Progesteron, sondern es lenkt dessen Metabolisierungsweg in eine andere Richtung.

Die Identifizierung der entstandenen Metaboliten wurde für 5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on in Tabelle 2 und für Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol in Tabelle 3 beschrieben. Die Identifizierung der Metaboliten 5 α -Pregnen-3,20-dion und 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol ist in den folgenden Tabellen 9 und 10 erläutert.

Tabelle 9

Identifizierung von 5 α -Pregnan-3,20-dion.

a = Chloroform-Aceton (9:1)

b = Äther-Dimethylformamid (99:1)

DC= Dünnschichtchromatographie

1. DC in a R_F=0,7 identisch mit dem von
authentischem 5 α -Pregnan-3,20-dion
2. Nach Oxydation Substanz ist unverändert. R_F=0,7.
DC in a
3. Nach Reduktion R_F=0,29 identisch mit dem des
gleichzeitig reduzierten
5 α -Pregnan-3,20-dion
DC in a
4. Umkristallisation mit 0,5 g authentischem
5 α -Pregnan-3,20-dion

Umkristallisation aus	ipm/mg
1. Aceton	149
2. Äthanol	149
3. Äthanol	136
4. Chloroform	140
5. Chloroform	144

Ergebnis: 5 α -Pregnan-3,20-dion

Tabelle 10

Identifizierung von 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol

a = Chloroform-Aceton (9:1)

b = Äther-Dimethylformamid (99:1)

DC=,Dünnschichtchromatographie

- | | |
|-------------------|---|
| 1. DC in a | $R_F=0,29$ identisch mit dem von
authentischem 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol |
| DC in b | $R_F=0,64$ identisch mit dem von
5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol |
| 2. Nach Oxydation | $R_F=0,7$ identisch mit dem von |
| DC in a | 5 α -Pregnan-3,20-dion |
| DC in b | $R_F=0,84$ identisch mit dem von
5 α -Pregnan-3,20-dion |

3. Umkristallisation mit 0,5 g authentischem
5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol

Umkristallisation aus	ipm/mg
1. Äthanol	184
2. Äthanol	190
3. Chloroform	194
4. Chloroform	179
5. Hexan	195

Ergebnis: 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol

In weiteren Inkubationsversuchen mit Leberschnitten adulter weiblicher Ratten konnte gezeigt werden, daß im zeitlichen Ablauf der Inkubation die Progesteronmetaboliten in einer bestimmten Reihenfolge gebildet werden. Diese Reihenfolge wird durch die Anwesenheit von Östradiol im Inkubationsgemisch erheblich verändert. Die praktische Durchführung dieser Inkubationen, die von dem in der Methodik beschriebenen Schema abweicht, ist in der Legende zu Tabelle 11 erläutert.

Bei alleiniger Inkubation von Progesteron-4-¹⁴C mit Leberschnitten entstehen während der gesamten Inkubationszeit überwiegend die am Ring A reduzierten Metaboliten. Während der 30 min. dauernden Inkubationszeit wird das Progesteron weitgehend metabolisiert, wobei fast ausschließlich biologisch inaktive Metaboliten übrig bleiben. Nur 14,7% des eingesetzten Progesteron-4-¹⁴C sind nach 30 min. nicht metabolisiert (Tab.11).

Bei Inkubation von Progesteron-4-¹⁴C mit Leberschnitten in Anwesenheit von inaktivem Östradiol als Wasserstoffdonator wird das Progesteron zuerst am C₂₀ der Seitenkette reduziert. Schon nach 5 min. Inkubationsdauer sind 29,2% des eingesetzten Progesteron zu Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol reduziert (Tab.11). Ohne Östradiol finden sich nur 1,9% dieses Metaboliten.

Im weiteren Verlauf der Inkubation verschiebt sich das prozentuale Verhältnis der Metaboliten wieder mehr auf die Seite der am Ring A reduzierten Metaboliten, sodaß am Ende der Inkubation etwa die gleiche Verteilung der Progesteronmetaboliten erreicht ist, wie sie in den Versuchen mit 60 min Inkubationsdauer festgestellt wurde (Tab.5, Tab.11).

Tabelle 11

Einfluß von Östradiol auf die Metabolisierung von Progesteron in Leberschnitten adulter weiblicher Ratten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.
Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Inkubationsbedingungen: 100±10 mg Leberschnitte in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob. Nach 5, 10 und 15 min. wurde jeweils 1 ml der Inkubationsflüssigkeit entnommen und jede dieser Teilentnahmen mit 5 ml Chloroform extrahiert. Der Rest mit den Leberschnitten wurde weitere 15 min. inkubiert und danach wie üblich mit Chloroform und Äthanol extrahiert.

Eingesetzte Steroide: (in 0,2 ml Äthanol gelöst)

0,58 µCi Progesteron-4-¹⁴C (6,3 µMol/l)

50γ Östradiol (43,7 µMol/l)

Die Gesamtaktivität jeder Teilentnahme wurde gleich 100% gesetzt.

Wiedergefundene Steroide	ohne Östradiol				mit Östradiol			
	min.				min.			
	5	10	15	30	5	10	15	30
5α-Pregnan-3,20-dion	8,9	6,8	9,5	9,2	1,3	2,3	3,0	3,4
5α-Pregnan-3α-ol-20-on	7,5	8,8	9,7	28,2	2,9	2,5	4,5	11,7
5α-Pregnan-3α,20α-diol	1,6	1,7	2,1	2,4	1,4	2,1	2,9	12,3
Δ ₄ -Pregnen-3-on-20α-ol	1,9	2,2	2,2	1,4	25,2	22,7	18,1	7,9
Progesteron	71,7	65,1	54,3	14,7	67,1	68,7	69,1	53,8
Nicht identif. Steroide	8,4	15,4	22,2	44,1	2,1	1,7	2,4	10,9

Angaben in % der Gesamtaktivität jeder Teilentnahme.

Obwohl die Progesteronmetabolisierung durch die rasche Reduktion der 20-Ketogruppe der Seitenkette in Anwesenheit von Östradiol anfangs beschleunigt ist, ist jedoch nach Ablauf der Inkubationszeit insgesamt weniger Progesteron metabolisiert und somit biologisch inaktiviert als ohne Östradiol (Tab.11).

Der erhebliche Einfluß des Östradiol auf die im Verlauf der Inkubation gebildeten Progesteronmetaboliten wird in der Abb. 3 nochmals graphisch dargestellt. Hier sind die in der Inkubationslösung nach 5, 10, 15 und 30 min. nachgewiesenen Metaboliten, die mit und ohne Einwirkung von Östradiol gebildet wurden, parallel aufgezeichnet. Besonders deutlich wird in dieser Abbildung das schon zu Inkubationsbeginn sprunghafte Auftreten des am Ring A reduzierten Metaboliten 5α -Pregnan-3,20-dion ohne Einwirkung von Östradiol und der noch deutlichere sprunghafte Anstieg des am C_{20} reduzierten Metaboliten Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol unter Östradioleinfluß.

Um die Spezifität der Wasserstoffübertragung vom C_{17} des Östradiol auf das C_{20} des Progesteron in Leberschnitten weiblicher Ratten nachzuweisen, wurden Progesteron-4- ^{14}C und Östradiol-17 α -T gemeinsam inkubiert. Dabei entstand doppelt markiertes Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol. Durch Vergleich der spezifischen Tritiumaktivität dieses Metaboliten ($\mu Ci/\mu Mol$) mit der bekannten spezifischen Aktivität des in verschiedenen Konzentrationen eingesetzten Östradiol-17 α -T konnte eine hohe Spezifität der Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron nachgewiesen werden. (Abb.4).

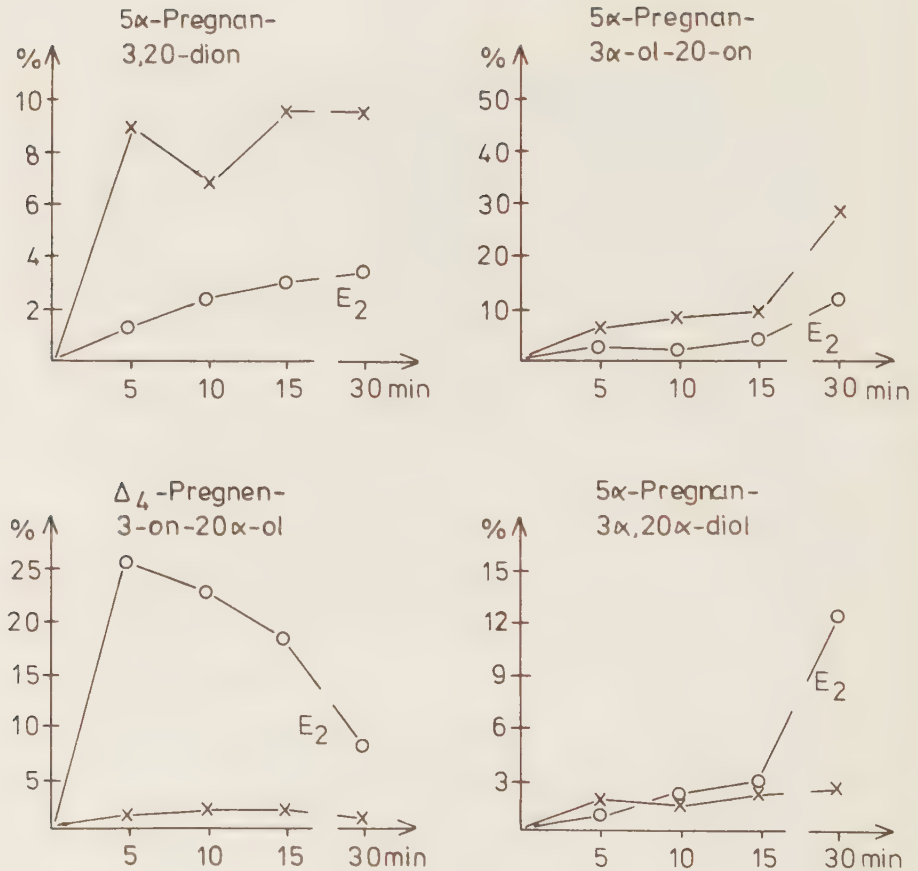


Abb. 3 Einfluß von Östradiol (E₂) auf die Metabolisierung von Progesteron in Leberschnitten weiblicher Ratten.

Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung siehe Tab.11.

Abszissen: Inkubationszeit in min.

Ordinaten: % der Gesamtaktivität jeder Teilentnahme

o — o = mit Östradiol (E₂)

x — x = ohne Östradiol

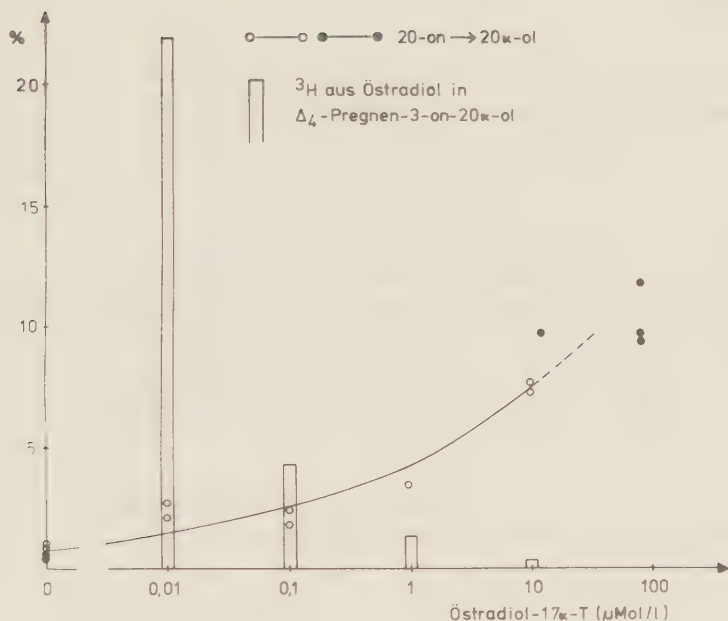


Abb. 4 Reduktion von Progesteron am C_{20} der Seitenkette durch Wasserstoffübertragung vom C_{17} des Östradiol in Leberschnitten adulter weiblicher Katten.

Inkubationsbedingungen: 100±10 mg Leberschnitte in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob, 60 min.

Eingesetzte Steroide:

Progesteron-4- ^{14}C (○ — ○ = 1,1 μMol/l)

(● — ● = 6,3 μMol/l)

Östradiol-17α-T (Konzentrationen siehe Abb.)

Die Kurve zeigt die Menge des gebildeten Δ_4 -Pregnen-3-on-20α-ol in % der eingesetzten ^{14}C -Aktivität.

Die Säulen zeigen den Einbau des von Östradiol-17α-T stammenden Tritium in Progesteron in % der eingesetzten ^3H -Aktivität.

Ergebnisse

Östradiol-Oxydation und Progesteronstoffwechsel im Ovar der Ratte.

Wiest et al. (3-5) haben bei in-vitro-Versuchen festgestellt, daß der bevorzugte Metabolisierungsweg in Rattenovarien die Reduktion der Seitenkette des Progesteron ist. Wenzel und Pollow (17) haben bei Inkubationsversuchen mit Rattenovarien eine Oxydation von Östradiol-17 α -T unter Bildung von tritiiertem Wasser (HTO) nachgewiesen.

In den bisher beschriebenen eigenen Versuchen konnte eine spezifische Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron in Rattenleber bewiesen werden. Es sollte deshalb geprüft werden, ob diese Reaktion bei Inkubation von Rattenovarien ebenfalls stattfindet. Da Östradiol im Ovar an C₁₇ oxydiert, und Progesteron an C₂₀ reduziert wird, erschienen die Voraussetzungen für eine Wasserstoffübertragung günstig.

Bei Inkubation von je einem zerkleinerten Ovar pro Ansatz mit Östradiol-17 α -T und inaktivem Progesteron wurde eine Oxydation des Östradiol-17 α -T unter HTO-Bildung gefunden. Zwischen 0,5 und 2,0% der eingesetzten Tritiumaktivität waren als HTO nachweisbar. Eine Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron konnte jedoch in keinem der Ansätze nachgewiesen werden. Radiochromatographisch stellte sich nur das noch nicht an C₁₇ oxidierte Östradiol-17 α -T dar (Abb.5).

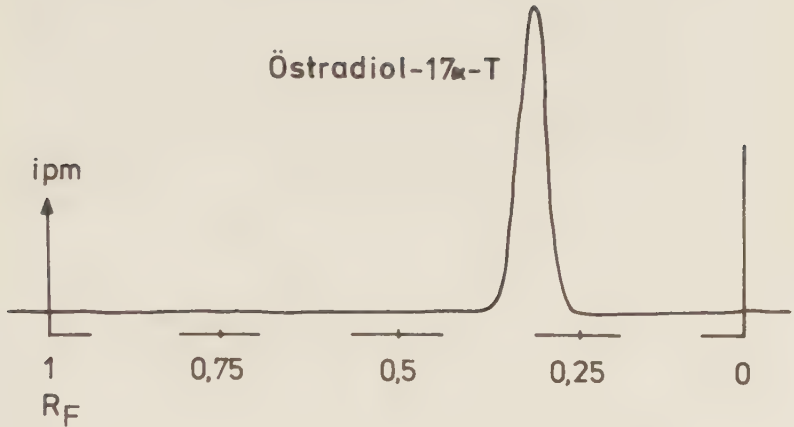


Abb. 5 Versuch der Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron in Rattenovarien.

Radio-Dünnschichtchromatogramm im Laufmittelsystem Chloroform-Aceton (9:1).

Inkubationsbedingungen: 1 mit der Schere zerkleinertes Ovar in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob, 60 min.

Eingesetzte Steroide (in 0,2 ml Äthanol gelöst):

7,84 µCi Östradiol-17α-T (19,0 µMol/l)

100 γ Progesteron (75,7 µMol/l).

Es stellen sich auch im empfindlichsten Meßbereich keine tritierten Progesteronmetaboliten dar. Eine Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron ist nicht nachweisbar.

Bei Inkubation von Progesteron mit Rattenovarien wird wie erwartet nur die Seitenkette des Progesteron reduziert. Dabei entsteht Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol (Abb.6).

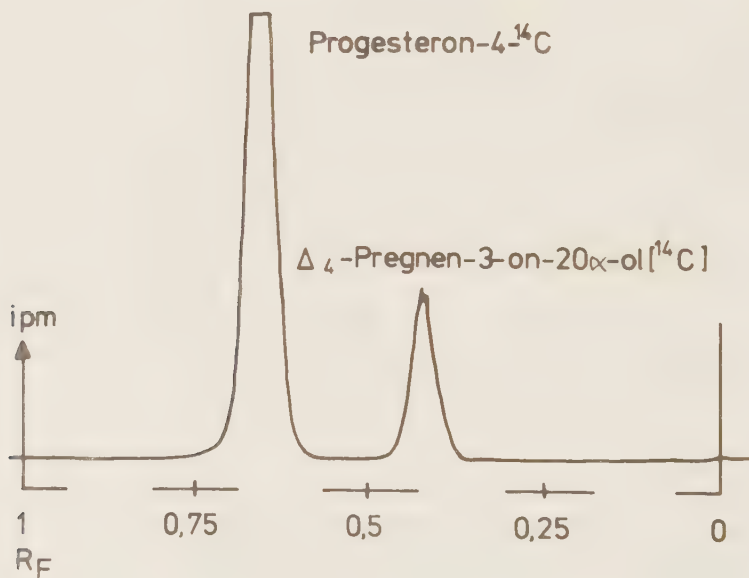


Abb. 6 Metabolisierung von Progesteron-4-¹⁴C bei Inkubation mit Ovarialgewebe der Ratte.

Radio-Dünnschichtchromatogramm im Laufmittelsystem Chloroform-Aceton (9:1).

Inkubationsbedingungen wie Abb.5.

Eingesetztes Steroid (in 0,2 ml Äthanol gelöst):

0,1 μ Ci Progesteron-4-¹⁴C (1,1 μ Mol/l).

Durchschnittlich 12,9% ($=1,98 \times 10^{-7}$ $\mu\text{Mol/mg Gewebe/min.}$) des eingesetzten Progesteron werden an C_{20} reduziert.

Die Anwesenheit von Östradiol in verschiedenen Konzentrationen bei gleichbleibender Konzentration von Progesteron-4- ^{14}C ($1,1 \mu\text{Mol/l}$) verändert die Menge des an C_{20} reduzierten Metaboliten nicht.

Bei Östradiol-Konzentrationen von 25 bis $400 \mu\text{Mol/l}$ beträgt die mittlere Ausbeute von Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol 10,1% ($=1,55 \times 10^{-7}$ $\mu\text{Mol/mg Gewebe/min.}$) des eingesetzten Progesteron.

Ergebnisse

Stoffwechsel von Östradiol, Progesteron und Androstendion in normalem Mammagewebe und in DMBA-induzierten Mammacarcinomen der Ratte.

Wie in Tab. 12 beschrieben, wurden 80 weibliche Ratten mit 7,12-Dimethyl-benzanthracen behandelt. Innerhalb eines Jahres entwickelten sich an 10 Tieren insgesamt 12 Tumoren. Histologisch handelte es sich um Fibrome, Adenocarcinome und ein medulläres Carcinom. Die Fibrome waren nicht in der Lage, Steroide zu metabolisieren und bleiben deshalb im Weiteren unberücksichtigt.

Tabelle 12. Durch 7,12-Dimethylbenzanthracen induzierte Mammatumoren der weiblichen Ratte.

80 weibliche Sprague-Dawley-Ratten erhielten im Alter von 50 $\pm$ 3 Tagen mit der Magensonde eine einmalige Dosis von 20 mg 7,12-Dimethyl-benzanthracen in Öl gelöst verabreicht.

Nr.	Gewicht des Tumors (g)	Histologische Diagnose	Zeit zwischen DMBA-Gabe und Versuchsbeginn in Tagen
1	5,4	Adenocarcinom	78
2	3,2	Fibrom	90
3	4,0	Fibrom	101
4	4,3	Adenocarcinom	109
5	8,5	Adenocarcinom	146
6	2,8	Fibrom	187
7	6,0	Adenocarcinom	200
8	6,3	Adenocarcinom	213
9	2,3	Adenocarcinom	240
10	2,7	Adenocarcinom	255
11	4,0	Adenocarcinom	255
12	1,9	Medulläres Ca.	255

Wie Breuer (37) beschrieben hat, können DMBA-Tumoren Östradiol in vitro metabolisieren. Dies konnte sowohl mit den eigenen DMBA-Tumoren als auch mit normalem Mammagewebe der Ratte nachgewiesen werden. Bei Inkubation von Östradiol- 17α -T mit den Gewebeschnitten von Mamma und DMBA-Tumoren konnten durchschnittlich 0,2% (entsprechend $1,19 \times 10^{-8}$ $\mu\text{Mol/mg Gewebe/min.}$) der eingesetzten Tritiumaktivität als HTO wiedergefunden werden. Unterschiede zwischen normalem Mammagewebe und DMBA-Tumoren ergaben sich dabei nicht. Insgesamt wurden 30 Einzelansätze mit normalem Mammagewebe und 42 mit DMBA-Tumoren hinsichtlich der Metabolisierung von Östradiol untersucht.

Bei der Chromatographie der organischen Extrakte der Inkubationsansätze mit Östradiol- 17α -T fand sich jedoch in allen mit DMBA-Tumoren durchgeführten Ansätzen neben dem nicht metabolisierten Östradiol- 17α -T ein radioaktives Maximum mit einem R_F -Wert von 0,6. In den Versuchen mit normalem Mammagewebe fehlte dieses Maximum (Abb.7). Durch gleichzeitig chromatographierte authentische Referenzsubstanzen konnten die Metaboliten Östron und Östriol ausgeschlossen werden. Um festzustellen, ob es sich bei der gefundenen Substanz um einen Östradiolmetaboliten handelt, wurde, nachdem die Substanz das erste Mal nachgewiesen worden war, in den folgenden DMBA-Tumor-Versuchen auch Östradiol-4- ^{14}C inkubiert. Auch hier konnte das radioaktive Maximum mit $R_F=0,6$ nachgewiesen werden. Somit handelt es sich bei der in einer Größenordnung von ca. 0,2% der eingesetzten Aktivität auftretenden Substanz zweifelsfrei um einen Östradiolmetaboliten, der jedoch an C_{17} unverändert sein muß. Die Identifizierung der Substanz ist nicht gelungen.

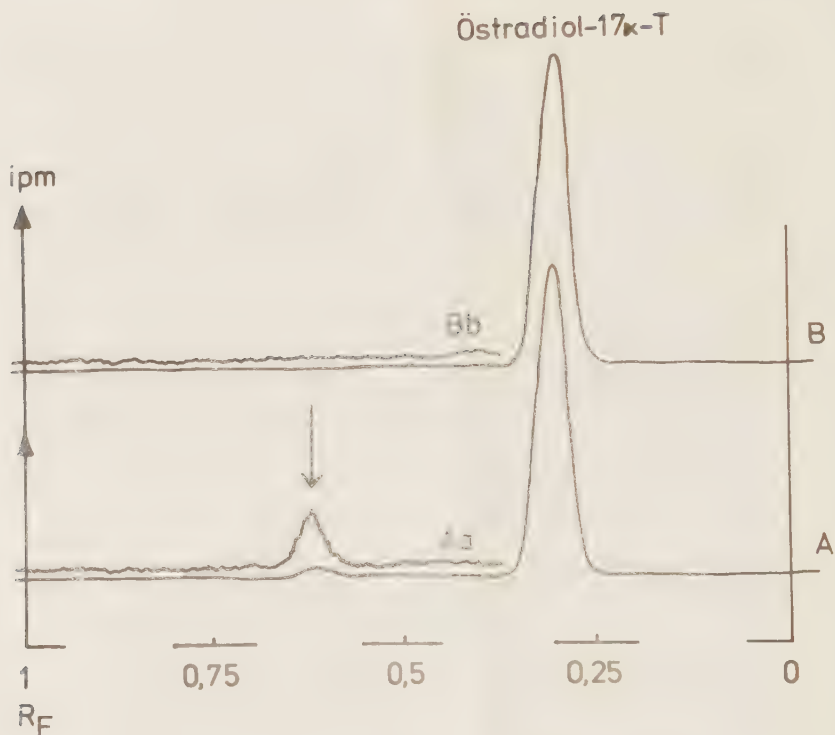


Abb. 1 Metabolisierung von Östradiol- 17α -T in DMBA-Tumor (A) und in normalem Mammagewebe (B) der Ratte. Radionünnenschichtenchromatogramm in dem Mittelsystem Chloroform-Aceton (9:1).

Inkubationsbedingungen: 200-30 mg Gewebeschnitte von Mammagewebe und DMBA-Tumor in jeweils 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob, 60 min. Eingesetztes Steroid (in 0,2 ml Äthanol gelöst):

7,0 μ Ci Östradiol- 17α -T (17,0 μ Mol/l).

Meßbereiche:

A,B 3×10^2 ips

Aa,Bb 3×10 ips

Nicht identifizierter Östradiolmetabolit ($R_F=0,6$) mit Pfeil markiert.

Obwohl normales Mammagewebe und DMBA-Tumoren in der Lage sind, Östradiol zu oxydieren und Progesteron zu reduzieren, wie im Folgenden gezeigt werden wird, konnte eine Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron nicht nachgewiesen werden. Nach Inkubation von Östradiol- 17α -T und Progesteron fand sich radiochromatographisch jeweils nur das nicht metabolisierte Östradiol- 17α -T. In den Inkubationen mit DMBA-Tumoren stellte sich, wie oben beschrieben, außerdem noch der nicht identifizierte Östradiolmetabolit mit $R_F=0,6$ dar.

Ganz erhebliche Unterschiede zwischen normalem Mammagewebe und DMBA-Tumoren ergaben sich aber hinsichtlich der Metabolisierung von Progesteron und Androstendion.

Wie aus der Literatur (7,8) bekannt und durch eigene Inkubationsversuche bestätigt, reduziert normales Mammagewebe Progesteron nur an der Seitenkette zu Δ_4 -Pregnen-3-on- 20α -ol (Abb.8).

Androstendion wird bei Inkubation mit normalem Mammagewebe der Ratte an C_{17} zu Testosteron reduziert. Das Radiochromatogramm eines solchen Inkubationsversuches zeigt die Abb.9.

Die Identifizierung des Testosteron wurde wie in Tabelle 13 beschrieben durchgeführt.

Bei Inkubation mit normalem Mammagewebe wurden 1,8% des eingesetzten Progesteron an C_{20} und 1,2% des Androstendion an C_{17} reduziert. Dies entspricht einem Umsatz von $6,93 \times 10^{-9}$ bzw. $5,04 \times 10^{-9}$ μ Mol/mg Gewebe/min. (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen).

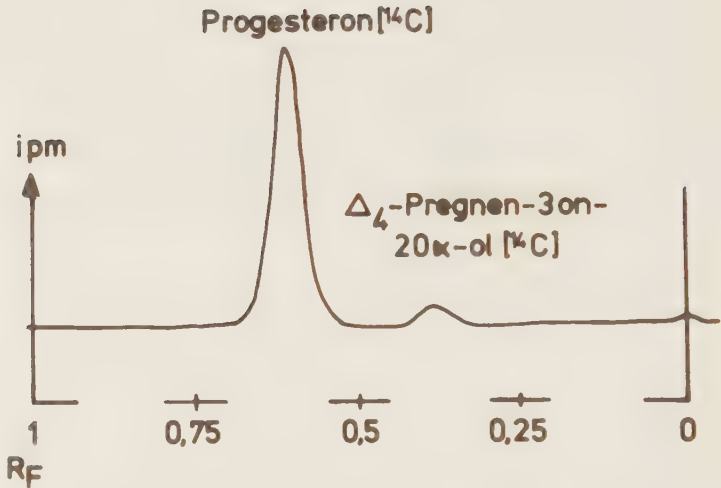


Abb.8 Metabolisierung von Progesteron in normalem Mammagewebe der Ratte.

Radiodünnschichtchromatogramm im Laufmittelsystem Chloroform-Aceton (9:1).

Inkubationsbedingungen: 200±20 mg Mammagewebeschnitte in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob, 60min.

Eingesetztes Steroid (in 0,2 ml Äthanol gelöst): 0,1 µCi Progesteron-4-¹⁴C (1,1 µMol/l).

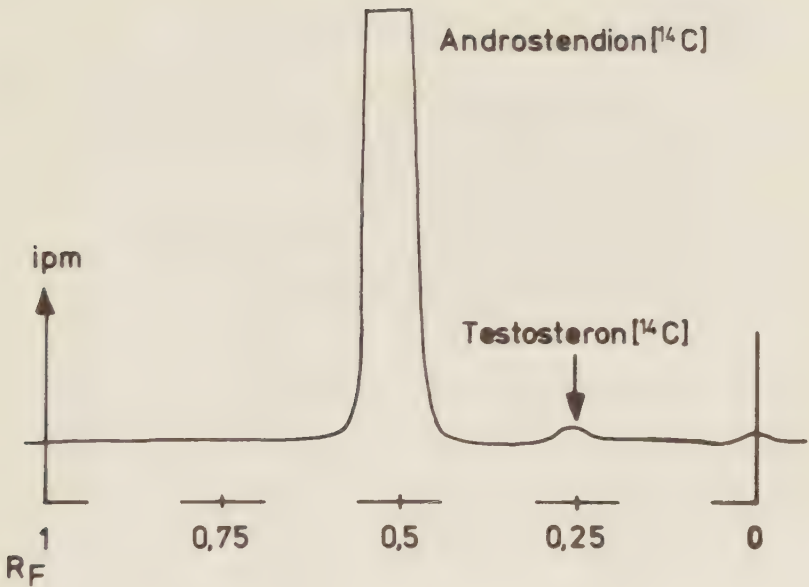


Abb.9 Metabolisierung von Androstendion in normalem Mammagewebe der Ratte.

Radiodünnschichtchromatogramm im Laufmittelsystem Chloroform-Aceton (9:1).

Inkubationsbedingungen: 200 ± 20 mg Mammagewebeschnitte in 4 ml Krebs-Kinger-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C , aerob, 60 min.

Eingesetztes Steroid (in 0,2 ml Äthanol gelöst):
 $0,29 \mu\text{Ci}$ Androstendion-4- ^{14}C ($1,2 \mu\text{Mol/l}$).

Tabelle 13

Identifizierung von Testosteron (-4-¹⁴C).

1. Dünnschichtchromatographie in Chloroform-Aceton (9:1):
R_F=0,26 identisch mit dem von Testosteron.
2. Nach Acetylierung Dünnschichtchromatographie in
Cyclohexan-Essigester (1:1) :
R_F=0,39 identisch mit dem von authentischem
Testosteronacetat.
3. Umkristallisation des ¹⁴C-markierten Acetats mit
0,5 g authentischem Testosteronacetat:

Umkristallisation aus	ipm/mg
1. Aceton	144
2. Aceton	151
3. Essigester	144
4. Toluol	151
5. Hexan	160

Ergebnis: Testosteron (-4-¹⁴C).

Einzelne DMBA-Tumoren haben jedoch auch den Ring A von Progesteron und Androstendion reduziert (Tab.14). Es wurden folgende, schon vom Leberstoffwechsel her bekannte Progesteronmetaboliten chromatographisch nachgewiesen und identifiziert:

5 α -Pregnan-3,20-dion, 5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on und 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol und wie in normalem Mammagewebe ebenfalls Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol (Abb.10).

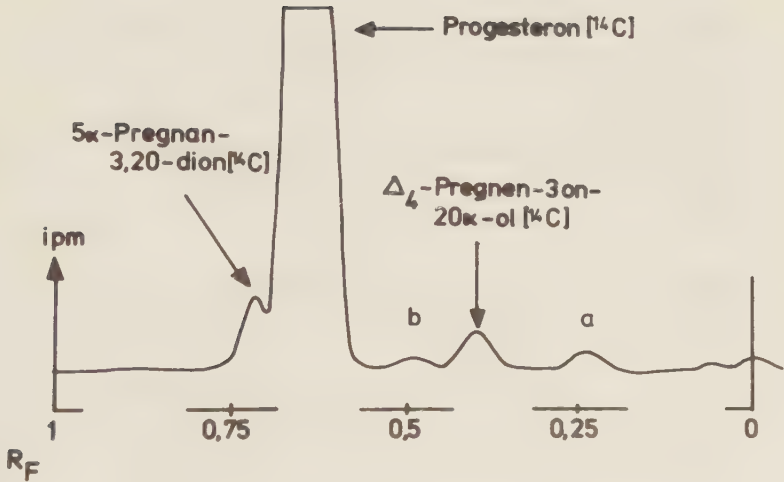


Abb.10 Metabolisierung von Progesteron in einem DMBA-Tumor der Ratte.

Radiodünnschichtchromatogramm im Laufmittelsystem Chloroform-Aceton (9:1).

Histologie des Tumors: Adenocarcinom (Tumor Nr.8)

Inkubationsbedingungen: 200±20 mg Tumorgewebeschnitte in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob, 60 min.

Eingesetztes Steroid (in 0,2 ml Äthanol gelöst):

0,1 µCi Progesteron-4-¹⁴C (1,1 µMol/l).

Die mit Buchstaben gekennzeichneten Metaboliten sind:

a 5α-Pregnan-3α,20α-diol

b 5α-Pregnan-3α-ol-20-on.

Tabelle 14

Ring A-Reduktion von Progesteron und Androstendion in DMBA-Tumoren der Ratte.

Inkubationsbedingungen: 200±20 mg Tumorgewebeschnitte in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob, 60 min.

Eingesetzte Steroide: (in 0,2 ml Äthanol gelöst)
0,1 µCi Progesteron-4-¹⁴C (1,1 µMol/l) oder
0,29 µCi Androstendion-4-¹⁴C (1,2 µMol/l).

Histologie der Tumoren siehe Tab.12.

Inkubiertes Gewebe von	Ring A-reduzierte Metaboliten von (in % der eingesetzten Aktivität)	
	Progesteron	Androstendion
Tumor 1	nicht nachweisbar	nicht geprüft
4	1,6 ± 0,2 (n=2)	nicht geprüft
5	4,1 ± 2,4 (n=4)	nicht geprüft
7	4,4 ± 0,5 (n=2)	5,0 ± 2,3 (n=2)
8	10,9 ± 0,1 (n=2)	10,7 (n=1)
9	0,5 ± 0,1 (n=2)	2,4 ± 0,7 (n=4)
10	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
11	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
12	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar

Bei den Androstendionmetaboliten handelt es sich nach Vergleich der R_F-Werte in zwei Laufmittelsystemen mit den R_F-Werten von authentischen Referenzsubstanzen offenbar um:

5α-Androstan-3,17-dion, 5α-Androstan-3α-ol-17-on, 5α-Androstan-3α,17α-diol und, wie auch in normalem Mammagewebe nachgewiesen, Testosteron (Abb.11).

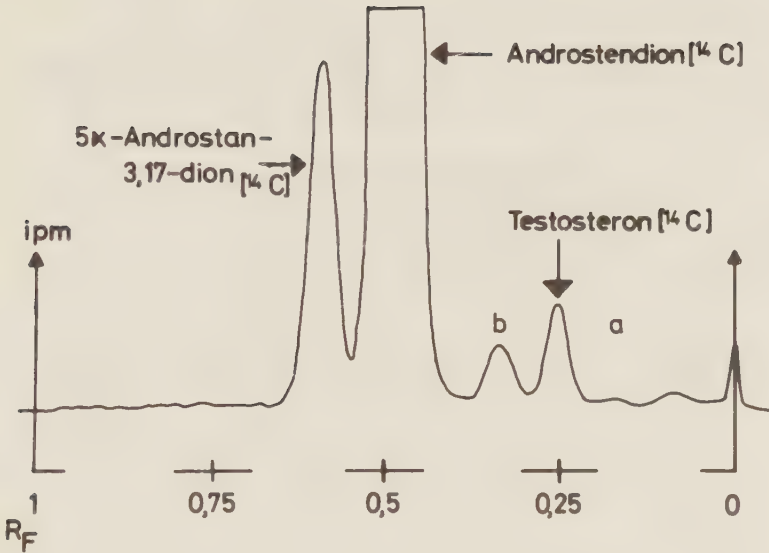


Abb.11 Metabolisierung von Androstendion in einem DMBA-Tumor der Ratte.

Radiodünnschichtchromatogramm im Laufmittelsystem Chloroform-Aceton (9:1).

Histologie des Tumors: Adenocarcinom (Tumor Nr.8).

Inkubationsbedingungen: 200±20 mg Tumorgewebeschnitte in 4 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH=7,4), 37°C, aerob, 60 min.

Eingesetztes Steroid (in 0,2 ml Äthanol gelöst): 0,29 µCi Androstendion-4-¹⁴C (1,2 µMol/l).

Die mit Buchstaben bezeichneten Metaboliten sind:

- a 5α-Androstan-3α,17α-diol
- b 5α-Androstan-3α-ol-17-on.

Eine exakte Identifizierung der Androstendionmetaboliten wurde nicht durchgeführt, weil auch schon durch die vorliegenden Befunde eindeutig bewiesen ist, daß DMBA-Tumoren im Gegensatz zu normalem Mammagewebe den Ring A des Androstendion zu reduzieren vermögen.

Die einzelnen Tumoren sind in ihrer Metabolisierungsleistung untereinander sehr verschieden (Tab.14, 15). Dies ist umso erstaunlicher als alle Tumoren außer Tumor Nr.12 histologisch das gleiche Bild bieten.

Einzelne Tumoren weisen die gleiche Metabolisierungsleistung wie normales Mammagewebe auf. Andere, insbesondere die Tumoren Nr.7 und 8 erreichen eine mit Lebergewebe vergleichbare Metabolisierungskapazität. In beiden Tumoren finden sich insgesamt jeweils durchschnittlich 12% Progesteron und Androstendionmetaboliten. Dies entspricht einem Umsatz von $4,62 \times 10^{-8}$ $\mu\text{Mol/mg Tumorgewebe/min}$. Der Tumor Nr.12 reduzierte 18,8% des Progesteron an C_{20} und 17,0% des Androstendion an C_{17} . Eine Reduktion des Ring A war in diesem Tumor nicht nachweisbar.

Diskussion

Metabolisierung von Progesteron in weiblicher Rattenleber

Als Hauptmetabolisierungsweg des Progesteron in Rattenleber ist die Reduktion des Ring A nachgewiesen (1,2).

Obwohl Hübener (40) in Rattenlebermikrosomen 20 α - und 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen fand, konnten die an der Seitenkette reduzierten Progesteron-metaboliten bei Inkubationsversuchen mit Rattenleber in nur geringer Menge nachgewiesen werden (2). Diese Befunde konnten in der vorliegenden Arbeit bei Inkubation von Leberschnitten weiblicher Ratten mit Progesteron-4-¹⁴C bestätigt werden (Abb.2, Tab.5, 6, 7, 8, 11).

Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron in weiblicher Rattenleber.

Ausgehend von den Versuchen von Wenzel und Pollow (17), die eine spezifische Wasserstoffübertragung vom C₁₇ des Östradiol auf das C₁₇ des Androstendion in Inkubationsversuchen mit Rattenleber fanden, wurde in dieser Arbeit eine Wasserstoffübertragung vom C₁₇ des Östradiol auf das C₂₀ des Progesteron bewiesen (Abb.1, Tab.4).

Bevorzugte Reduktion der Seitenkette des Progesteron in Anwesenheit von Östradiol.

Die Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron wies nicht nur eine hohe Spezifität auf (Abb.4), sondern führte darüber hinaus zu einer

erheblichen Veränderung des Metabolisierungswegs des Progesteron. In Anwesenheit von Östradiol im Inkubationsgemisch werden bevorzugt die an der Seitenkette reduzierten Progesteronmetaboliten gebildet (Abb.2, Tab.5, 6, 7, 8, 11).

Für die gegenüber anderen NAD-reduzierenden Substraten ohne Steroidstruktur hohe Spezifität der Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden an C₁₇ haben Wenzel und Bollert (24) die langsame Dissoziation des NAD-Dehydrogenase-Komplexes mit einem raschen Austausch der Steroidmoleküle an diesem Enzym-Coenzym-Komplex nachgewiesen. Voraussetzung dafür aber ist eine gewisse Substratspezifität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

Überträgt man diese Vorstellung auf die Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden von C₁₇ auf C₂₀, so bedeutet dies entweder, daß die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und die 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase identisch sind, oder, daß eine oder beide ebenfalls eine nur geringe Substratspezifität haben.

Für die Vorstellung, daß es sich um ein unspezifisches Enzym handelt, wahrscheinlich die 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, das sowohl die Oxydation des Östradiol als auch die Reduktion des Progesteron bewirken kann, spricht die Tatsache, daß die Reduktionfunktion des Enzyms durch die Anwesenheit von Östradiol gewissermaßen aktiviert wird. Bei den Inkubationsversuchen mit Rattenleber war die Reduktion der 20-Ketogruppe des Progesteron in Anwesenheit von Östradiol bis zu 180-fach höher als ohne Östradiol (Tab.5, 6, 7, 8, 11).

Ein weiterer Gesichtspunkt in dieser Richtung kommt hinzu, wenn man die Ergebnisse von Pollock (39) mit einbezieht, der im menschlichen Endometrium eine

Aktivierung der 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase durch Östrogene fand. Dadurch ergibt sich für die 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase beim Menschen eine Schlüsselfunktion für die Gestagenaktivität im Uterus während des Menstruationszyklus (16).

Vergleich der mit Rattenleber in vitro gewonnenen Ergebnisse mit den in vivo herrschenden Bedingungen.

Beim Vergleich der in vitro erzielten Ergebnisse mit den Verhältnissen im intakten Organismus muß selbstverständlich berücksichtigt werden, daß die in den Inkubationsversuchen gewählten Steroidkonzentrationen teilweise erheblich höher sind als unter physiologischen Bedingungen im intakten Organismus. Die Plasmakonzentrationen beim Menschen betragen für Östradiol ca. $1,1 \times 10^{-3}$ bis $1,1 \times 10^{-4}$ $\mu\text{Mol/l}$, für Progesteron, abhängig von den physiologischen Funktionszuständen, in der Proliferationsphase ca. $3,2 \times 10^{-3}$ $\mu\text{Mol/l}$, in der Sekretionsphase ca. $6,3 \times 10^{-2}$ $\mu\text{Mol/l}$ und in der späten Gravidität ca. 0,6 $\mu\text{Mol/l}$ (15).

Die in den Inkubationsansätzen angewendeten Konzentrationen liegen also insbesondere für Östradiol weit über dem physiologischen Bereich, erreichen allerdings für Progesteron nahezu physiologische Werte. Zudem kann man von der Plasmakonzentration nicht zwingend auf die Konzentration in der Zelle innerhalb des intakten Organismus schließen, somit auch nicht aus der Konzentration in einer Inkubationslösung auf die Konzentration in der im Gewebeschnitt inkubierten Zelle.

Trotz dieser Einschränkung der Vergleichbarkeit ergibt die Annahme, daß die 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in vitro durch Östradiol stimuliert wird, auch auf den Gesamtorganismus übertragen, eine

sinnvolle Vorstellung von der Regulation der Östrogene und Gestagene innerhalb des Rückkopplungsmechanismus mit den Gonadotropinen beim Menschen.

Bekannt ist, daß in der Proliferationsphase die hohe FSH-Ausschüttung eine hohe Östradiolproduktion mit einem steilen Gipfel am Vortag der Ovulation bewirkt. In der gleichen Zeit ist die LH-Ausschüttung gering, somit auch die Progesteronproduktion. Zum Zeitpunkt der Ovulation kommt es zu einem steilen Anstieg der LH-Ausschüttung und zum Ansteigen der Progesteronproduktion.

Man könnte also vermuten, daß der im Plasma nachgewiesene, steile Östradiolgipfel über eine Stimulierung der 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase der Leber einen akuten Abfall des Progesteronspiegels im Plasma bewirkt. Dieser relative Progesteronmangel könnte über die Rückkopplung mit der Hypophyse wiederum den etwa einen Tag nach dem Östradiolgipfel nachgewiesenen LH-Gipfel auslösen und so die in der Sekretionsphase erhöhte Progesteronproduktion in Gang bringen.

Da aber die Gesamtmenge des in 24 Stunden gebildeten Östradiol nur etwa ein Hundertstel der in der gleichen Zeit produzierten Progesteronmenge ausmacht, muß man schließen, daß die Aktivierung der 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase nicht darin bestehen kann, daß sie Wasserstoff in stöchiometrischem Verhältnis von Östradiol auf Progesteron überträgt. Vielmehr muß man hier eine katalytische Funktion des Östradiol annehmen.

Die von Pollow und Boquoi (38) nachgewiesene Aktivierung der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase durch Progesteron in der zweiten Zyklushälfte schließt den Regelkreis.

Metabolisierung von Östradiol und Progesteron in Rattenovarien

Die in den Versuchen mit Rattenleber erhobenen Befunde unterscheiden sich sehr deutlich von den Metabolisierungsvorgängen im Ovar der Ratte. Wie aus der Literatur (3-5) bekannt, ist der Hauptmetabolisierungsweg für Progesteron im Ovar der Ratte die Reduktion am C₂₀ der Seitenkette zu Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol. Dasselbe gilt für das menschliche Ovar, in dem mehr Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol als Progesteron selbst gefunden wird (16). Da andererseits Östradiol an C₁₇ im Ovar der Ratte oxydiert wird (17), könnte man bei Inkubation von Ovarialgewebe eine Reduktion des Progesteron durch Östradiol erwarten, wie dies in Leberschnitten weiblicher Ratten nachgewiesen wurde. Dieser Vorgang ließ sich jedoch weder direkt durch Wasserstoffübertragung (Abb.5) noch indirekt durch den Versuch, die 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase mit verschiedenen Östradiolkonzentrationen bei gleichbleibender Progesteronkonzentration zu stimulieren, nachweisen. Diese Tatsache läßt zumindest zwei Interpretationsmöglichkeiten zu:

1. Die zweifellos im Ovar vorhandene 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und die 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase haben eine sehr viel strengere Substratspezifität als diejenigen in der Leber.
2. Eine strenge Aufteilung der beiden Metabolisierungsvorgänge auf verschiedene Zellen oder Zelltypen (Granulosazellen, Thekazellen), möglicherweise sogar eine strenge räumliche Kompartimentierung innerhalb einer Zelle verhindern die Redox-Reaktion zwischen diesen beiden Steroiden im Ovar.

Die erste Möglichkeit erscheint biologisch sinnvoll, weil die Leber als größtes Stoffwechsel und Entgiftungsorgan zur Inaktivierung von Steroiden nicht

unbedingt hochspezifische Enzyme benötigt.

Wenzel und Wolf (23) haben eine Kompartimentierung innerhalb der Rattenleberzelle als Ursache für die bevorzugte Wasserstoffübertragung zwischen Steroiden ausgeschlossen.

Dagegen erscheint diese Interpretation für das Nichtstattfinden dieser Reaktion im Ovar der Ratte sinnvoll. Denn durch eine strenge Kompartimentierung wird die für den Organismus unerwünschte gegenseitige Inaktivierung von Steroiden schon vor Verlassen des Bildungsorgans (Follikel, corpus luteum) und vor Erreichen der Zielorgane verhindert.

Mit der Kompartimentierung der Zelle könnte man auch die im Vergleich mit den eigenen Ergebnissen zunächst widersprüchlich erscheinenden Befunde von Zmigrod (10) und Mason (13) erklären. Diese Autoren haben in der Mikrosomenfraktion von Rattenovarien auch die den Ring A reduzierenden Enzyme nachgewiesen.

In den eigenen, mit geschnittenen Ovarien durchgeführten Inkubationsversuchen konnten dagegen die am Ring A reduzierten Progesteronmetaboliten nicht nachgewiesen werden.

Dies könnte bedeuten, daß in einer intakten Zelle mit intakter Kompartimentierung Progesteron nicht mit den doch offenbar in den Mikrosomen der Ovarialzellen vorhandenen, den Ring A reduzierenden Enzymen in Kontakt kommt.

Auch diese Vorstellung erscheint biologisch sinnvoll, denn es kann nicht Aufgabe des gegenüber der Leber verschwindend kleinen Ovars sein, Steroide zu inaktivieren.

Dagegen bedeutet die an intakten Zellen des Ovars nachgewiesene Reduktion der Ketogruppe an C_{20} nur eine vorübergehende, reversible Inaktivierung des Progesteron. Die Reversibilität der C_{20} -Reduktion ist im menschlichen Endometrium nachgewiesen (16).

Vergleich der Metabolisierung von Östradiol, Progesteron und Androstendion in normalem Mammagewebe und im DMBA-Tumor der Ratte.

Beim Vergleich der Metabolisierung von Östradiol, Progesteron und Androstendion in normalem Mammagewebe der Ratte mit der in DMBA-Mammatumoren ergaben sich interessante Aspekte hinsichtlich der Therapie dieser Tumoren mit Steroidhormonen, insbesondere mit Androgenen und Gestagenen.

Bei Inkubationsversuchen wurde Östradiol- 17α -T in normalem Mammagewebe der Ratte und gleichermaßen in den DMBA-Tumoren in geringem Ausmaß an C_{17} unter Bildung von HTO oxydiert. Eine Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron konnte in beiden Gewebearten nicht nachgewiesen werden.

Bei den Inkubationsversuchen der DMBA-Tumoren mit Östradiol- 17α -T (bzw. -4- ^{14}C) konnte im Laufmittelsystem Chloroform-Aceton (9:1) regelmäßig ein Metabolit mit einem R_F -Wert=0,6 in geringen Mengen nachgewiesen werden. Dieser Östradiolmetabolit fehlte bei den Inkubationen mit normalem Mammagewebe (Abb.7). Die Interpretation dieses Befundes muß leider offen bleiben, da der Metabolit nicht identifiziert werden konnte.

Bezüglich der Metabolisierung von Progesteron und Androstendion ergaben sich erhebliche Unterschiede zwischen normalem Mammagewebe und DMBA-Tumoren. Zusätzlich zeigten die einzelnen DMBA-Tumoren, obwohl histologisch einheitlich, untereinander qualitativ und quantitativ außerordentlich variable Metabolisierungsleistungen (Tab.14, 15).

Tabelle 15

Metabolisierung von Progesteron und Androstendion
in Inkubationsversuchen mit DMBA-Mammatumoren und
mit normalem Mammagewebe der Ratte.

Inkubationsbedingungen und eingesetzte Steroide
siehe Tab.14.

Histologie der Tumoren siehe Tab.12.

Inkubiertes Gewebe	Reduktion der Steroide			
	Progesteron		Androstendion	
	C ₂₀	Ring A	C ₁₇	Ring A
Normales Mammagewebe	+	-	+	-
Tumor 1	-	-	o	o
4	+	+	o	o
5	+	+	o	o
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
10	-	-	+	-
11	-	-	+	-
12	+	-	+	-

Zeichenerklärung:

- + Reduktion nachweisbar
- Reduktion nicht nachweisbar
- o nicht geprüft

In den eigenen Inkubationsversuchen mit normalem Mammagewebe der Ratte konnte, wie in der Literatur (7,8) beschrieben, die Reduktion des Progesteron an C₂₀ zu Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol bestätigt werden (Abb.8). Ebenso die Reduktion des Androstendion

an C₁₇ zu Testosteron (Abb.9). Die am Ring A reduzierten Metaboliten konnten nicht nachgewiesen werden.

Dagegen waren einzelne DMBA-Tumoren in der Lage, den Ring A des Progesteron und des Androstendion zu reduzieren (Tab.14). Andere reduzierten nur jeweils C₁₇ bzw. C₂₀ der genannten Steroide. Insgesamt lassen die erhobenen Befunde, die in Tabelle 15 qualitativ als Übersicht dargestellt sind, eine gewisse Tumor-individualität erkennen. Das Enzymmuster und dessen Leistungsfähigkeit ist offenbar von Tumor zu Tumor sehr unterschiedlich beschaffen.

Bei der großen Metabolisierungskapazität einzelner Tumoren muß in Anbetracht der oft recht beachtlichen Größe des Tumors, dessen Weiterwachstum doch nur durch den Einsatz im Versuch beendet wurde, ein erheblicher Verlust des Gesamtorganismus an biologisch aktiven Steroiden wie z.B. Androstendion und Progesteron resultieren. Auch wenn die Metabolisierung durch den Tumor für die Konstanz eines bestimmten Hormonspiegels im Plasma keine Bedeutung haben sollte, so spielt doch möglicherweise die im Tumor selbst stattfindende Inaktivierung dieser Steroide für das Wachstum des Tumors eine Rolle.

Hier ergibt sich ein interessanter Aspekt hinsichtlich der seit langem diskutierten und inzwischen wohl allgemein akzeptierten, wachstumsfördernden Wirkung von Östrogenen auf bestehende Mamma- und Endometriumcarcinome (15).

In DMBA-Tumoren konnten Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden (34, 35). Radioaktiv markiertes Östradiol wurde in vivo und in vitro in das Cytoplasma und in den Kern dieser Tumorzellen aufgenommen.

Da in der vorliegenden Arbeit eine nur geringe Östradiolmetabolisierung durch diese Tumoren gefunden wurde, muß man annehmen, daß es in der Tumorzelle zu einer Kumulierung von Östradiol kommt.

Die vermutete hohe Östradiolkonzentration in der Tumorzelle könnte die Ursache der proliferativen Wirkung des Östradiol für eben diese Zellen sein.

Hinzu kommt, daß andere Steroidhormone, die als Antagonisten von Östradiol die Aufnahme des Östradiol in die Zelle oder die proliferative Wirkung in der Zelle hemmen könnten, von der Tumorzelle selbst metabolisiert und so inaktiviert werden.

Die in zahlreichen Untersuchungen (28-36) beschriebenen Therapieerfolge an DMBA-Tumoren mit Androgenen und Gestagenen, sowie die Hemmung der Östrogenrezeptoren durch diese Steroide könnte man dann folgendermaßen erklären:

1. Durch die weit über dem physiologischen Bereich liegende Dosierung, wie sie auch in der Humanmedizin Anwendung findet, mit Androgenen oder Gestagenen kommt es durch kompetitive Hemmung am Östrogenrezeptor zu einer verminderten Östrogenaufnahme in die Zelle.

2. Durch die hohe Steroiddosis wird die Metabolisierungsleistung des Tumors überschritten. Somit können die therapeutisch verabreichten Steroide die proliferative Wirkung des Östradiol hemmen.

Einen solchen Vorgang haben Pollow und Boquoi (38) in der Aktivierung der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase durch Progesteron in Endometriumcarcinomen der Frau nachgewiesen.

Die Therapie von Mamma- oder Endometriumcarcinomen mit Steroidhormonen wird heute eher schematisch nach histologischer Diagnose oder seltener nach Bestimmung von Östrogenrezeptoren durchgeführt.

Metabolische Untersuchungen des bei der Operation entnommenen Tumorgewebes lassen möglicherweise in der Zukunft eine differenziertere Therapie dieser Tumoren zu.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Metabolisierung von Progesteron in Leber, Ovar, Mammagewebe und in DMBA-Tumoren der weiblichen Ratte untersucht. Außerdem wird geprüft, ob eine Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron in diesen Geweben stattfindet, und inwieweit der Metabolisierungsweg des Progesteron durch Östradiol beeinflusst wird. Darüber hinaus wird in einigen DMBA-Tumoren die Metabolisierung von Androstendion untersucht.

In den Inkubationsversuchen mit Leberschnitten weiblicher Ratten wird eine spezifische Wasserstoffübertragung vom C₁₇ des Östradiol auf das C₂₀ des Progesteron nachgewiesen. Dadurch ergibt sich eine erhebliche Veränderung der Metabolisierung von Progesteron. Es werden nicht mehr, wie bekannt, die am Ring A reduzierten Metaboliten bevorzugt gebildet. In Anwesenheit von Östradiol werden überwiegend die am C₂₀ der Seitenkette reduzierten Metaboliten Δ_4 -Pregnen-3-on-20 α -ol und 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol nachgewiesen.

Diese Befunde werden gleichermaßen, mit nur geringen quantitativen Unterschieden in Leberschnitten von adulten, trächtigen, infantilen und kastrierten Rattenweibchen erhoben.

Es wird außerdem gezeigt, daß im zeitlichen Ablauf der Inkubation ohne Östradiol kontinuierlich der Ring A des Progesteron reduziert wird. In Anwesenheit von Östradiol kommt es dagegen zunächst zu einer sprunghaften Steigerung der Reduktion des C₂₀ der Seitenkette. Die Reduktion des Ring A tritt demgegenüber weit zurück.

In den Inkubationsversuchen mit Ovarialgewebe der Ratte ist eine Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron nicht nachzuweisen, obwohl Östradiol an C₁₇ oxydiert und Progesteron an C₂₀ reduziert werden.

Die Metabolisierung des Progesteron, d.h. die nachgewiesene Reduktion an C₂₀, wird durch die Anwesenheit von Östradiol nicht verändert.

Im normalen Mammagewebe und in DMBA-Tumoren der weiblichen Ratte ist eine Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Progesteron nicht nachweisbar. Östradiol wird sowohl von normalem Mammagewebe als auch von DMBA-Tumoren oxydiert. Zusätzlich wird in den DMBA-Tumor-Versuchen ein noch nicht identifizierter Östradiolmetabolit nachgewiesen.

Bei der Metabolisierung von Progesteron und Androstendion ergeben sich erhebliche Unterschiede zwischen dem gesunden und dem carcinomatösen Gewebe. So wird in normalem Mammagewebe Progesteron nur an C₂₀ und Androstendion nur an C₁₇ reduziert.

In einzelnen DMBA-Tumoren wird aber neben der Reduktion des C₂₀ bzw. des C₁₇ auch eine beträchtliche Reduzierung des Ring A beider Steroide nachgewiesen. Überraschend ist, wie weit die Metabolisierungsleistung und das Enzymmuster histologisch gleicher Tumoren voneinander abweichen.

Die biologische Bedeutung der in vitro gewonnenen Ergebnisse für den intakten Gesamtorganismus wird diskutiert.

Literatur

1. Taylor, W. Biochem.J.
56, 463 (1954)
2. Shirley, J. J. Endocrinol.
Cooke, B. 40, 477 (1968)
3. Wiest, W.G. Endocrinology
72, 310 (1963)
4. Wiest, W.G. J. Biol. Chem.
234, 3115 (1959)
5. Wiest, W.G. J. Biol. Chem.
221, 461 (1956)
6. Forchielli, E. Proc. Soc. exp. Biol. Med.
Brown-Grant, K. 99, 594 (1958)
Dorfman, R.I.
7. Taylor, W. Biochem. J.
60, 380 (1955)
8. Lawson, D.E.M. J. Biol. Chem.
Pearlman, W.H. 239, 3226 (1964)
9. Rao, L.G.S. Biochem. J.
Taylor, W. 96, 172 (1965)
10. Zmigrod, A. Acta Endocrinolog.
Lindner, H.R. 69, 141 (1972)
Lamprecht, S.A.
11. Wichman, K. Acta Endocrinol. Suppl.
116 (1967)

- | | | |
|-----|--|--|
| 12. | Rubin, B.L.
Chase Jr., H.S. | Steroids
<u>19</u> , 59 (1971) |
| 13. | Mason, N.R. | Endocrinology
<u>87</u> , 350 (1970) |
| 14. | Townsend, L.
Ryan, K.J. | Endocrinology
<u>87</u> , 151 (1970) |
| 15. | Tausk, M. | Pharmakologie der Hormone
Georg Thieme Verlag
Stuttgart (1973) |
| 16. | Träger, L. | Steroidhormone
Springer Verlag Berlin
Heidelberg New York (1977) |
| 17. | Wenzel, M.
Pollow, K. | Hoppe-Seyler s Z. Physiol.
Chem.
<u>348</u> , 1667 (1967) |
| 18. | Wenzel, M.
Pollow, K. | Hoppe-Seyler s Z. Physiol.
Chem.
<u>349</u> , 1357 (1968) |
| 19. | Wenzel, M.
Pollow, K.
Ziebarth, T. | Z. Naturforsch.
<u>22b</u> , 895 (1967) |
| 20. | Wenzel, M. | Biochem. Biophys. Acta
<u>152</u> , 431 (1968) |
| 21. | Wenzel, M.
Langold, M.
Hallac, P. | J. Biol. Chem.
<u>244</u> , 4523 (1969) |

22. Wenzel, M. Hoppe-Seyler s Z. Physiol.
Mützel, W. Chem.
351, 1221 (1970)
23. Wenzel, M. Hoppe-Seyler s Z. Physiol.
Wolf, S. Chem.
350, 1203 (1969)
24. Wenzel, M. Hoppe-Seyler s Z. Physiol.
Bollert, B. Chem.
355, 969 (1974)
25. Wenzel, M. Acta Endocrinolog.
67, 517 (1971)
26. Wenzel, M. Hoppe-Seyler s Z. Physiol.
Pitzel, L. Chem.
356, 459 (1975)
27. Wenzel, M. Die Naturwissenschaften
52, 129 (1965)
28. Huggins, C. Nature (London)
Grand, L.C. 189, 204 (1961)
Brillantes, F.P.
29. Huggins, C. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)
Moon, R.C. 48, 379 (1962)
Morii, S.
30. Teller, M.N. Proc. Am. Assoc. Cancer Res.
Kaufman, R.J. 5, 63 (1964)
Escher, G.C.
Bowie, M.
Ruark, M.A.

31. Teller, M.N. Cancer Res.
Kaufman, R.J. 28, 368 (1968)
Stock, C.C.
Bowie, M.
32. Young, S. British J. Cancer
Baker, R.A. 19, 155 (1965)
Helfenstein, J.E.
33. Kellen, J.A. Z. Krebsforsch.
79, 75 (1973)
34. Boylan, E.S. Cancer Res.
Wittliff, J.L. 35, 506 (1975)
35. Sasaki, G.H. Cancer
Leung, B.S. 35, 645 (1975)
36. Levin, J.M. Cancer
Goldman, A.S. 38, 56 (1976)
Rosato, F.E.
Rosato, E.E.
37. Breuer, H. Z. Krebsforsch.
Breuer, J. 67, 247 (1965)
Schmährl, D.
38. Follow, K. Z. Krebsforsch.
Boquoi, E. 86, 231 (1976)
39. Follow, K. Endocrinology
Lübbert, H. 96, 319 (1975 c)
Boquoi, E.
Kreuzer, E.
Follow, B.
40. Hübener, H.J. J. Biol. Chem.
Fukushima, D.K. 220, 499 (1956)
Gallagher, T.F.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Biochemischen
und Isotopen-Abteilung des Instituts für Pharmazie der
Freien Universität Berlin unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. M. Wenzel.

Herrn Prof. Dr. Wenzel gilt mein besonderer Dank für
die Überlassung des Themas, für die gute Betreuung
und für die vielen wertvollen Anregungen bei der
Anfertigung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Michael Langold, geb. 16.9.1943 in Karlsruhe; wohnhaft
in 6000 Frankfurt/Main 56, An der Pfarrwiese 8.
Vater: Ulrich Langold, geb. 22.1.1914 in Hannover;
Rentner.

Mutter: Irmgard Langold, geborene Gegenheimer,
geb. 30.10.1920 in Ettlingen; Rentnerin.

Schul Ausbildung: 3 1/2 Jahre Grundschule, 9 Jahre
humanistisches Gymnasium. Im Frühjahr 1963
Abitur am Grimmelshausen-Gymnasium, Offenburg.

Wehrdienst: 1.4.1965 bis 31.3.1965.

Hochschulstudium: Studium der Humanmedizin an der
Freien Universität Berlin vom Sommersemester
1965 bis zum Wintersemester 1970/71.
Staatsexamen am 26.2.1971 dort bestanden.

Eheschließung: mit Karla Langold, geborene Haake,
geb. 5.2.1944 in Glienicke/Oranienburg, auf
dem Standesamt Frankfurt/Main, am 19.4.1974.

Berufsausbildung: Ausbildung als Medizinalassistent
vom 1.5.1971 bis 30.4.1972 an den Universitäts-
kliniken der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität,
Frankfurt/M. und am Bürgerhospital, Frankfurt/M.
Am 3.5.1972 Erteilung der Approbation als Arzt.
Vom 1.5.1972 bis 30.4.1977 Weiterbildung an der
Frauenklinik im Bürgerhospital, Frankfurt/M.
unter der Leitung von Herrn Prof.Dr. H. Wagner.
Am 1.5.1977 Anerkennung als Arzt für Frauen-
heilkunde und Geburtshilfe.
Seit dem 1.5.1977 Tätigkeit als Oberarzt der
Frauenklinik im Bürgerhospital, Frankfurt/M.

